

## API STAPH-IDENT system에 의한 돼지 및 닭由來 *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus*의 同定

朴 清 圭

慶北大學校 獸醫科大學  
(1994년 4월 12일 접수)

### Identification of *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus* of swine and poultry origin by API STAPH-IDENT system

Cheong-kyu Park

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University

(Received April 12, 1994)

**Abstract :** The API STAPH-IDENT system was evaluated as a means for identifying *Staphylococcus hyicus* subsp *hyicus* strains isolated from swine and poultry. Of 80 strains from swine, 68 (85%) were correctly identified by the API STAPH-IDENT system alone after 5 h of incubation. When results were determined after 24 h of incubation, the accuracy of this system alone was 93.8%. By additional tests in conjunction with the API STAPH-IDENT system, however, all 80 strains could be correctly identified.

Of 120 strains from poultry, 87 (72.5%) required additional testing to achieve a correct identification, and 33 (27.5%) were incorrectly identified by this system after 5 h of incubation. After 24 h of incubation, 99 of 120 (82.5%) avian strains were incorrectly identified as *Staph epidermidis* owing to false-negative mannose and trehalose utilizations.

Seventy-seven (96.3%) of swine strains were positive for  $\beta$ -glucuronidase, whereas all 120 strains recovered from poultry were negative for it.

**Key words :** *Staphylococcus hyicus*, swine, poultry, API STAPH-IDENT system, identification,  $\beta$ -glucuronidase.

### 緒 論

1953년에 Sompolinsky<sup>1</sup>는 滲出性表皮炎(exudative epidermitis)에 罹患된 哺乳仔豚으로부터 그람양성의 球菌을 분리하고 病因體를 *Micrococcus hyicus*라 命名하였다. 그후 이菌은 여러 研究者<sup>2-4</sup>에 따라 다양한 菌名으로 報告되어 오다가 近年에 와서 Devriese et al<sup>5</sup>이 이菌을 *Staphylococcus hyicus*라 고쳐 命名하고 이 菌種을 다시 *Staph hyicus* subsp *hyicus*와 *Staph hyicus* subsp *chromogenes*의 2 亞種으로 분류하였으며 前者는 哺乳

仔豚의 滲出性表皮炎이외의 多發性關節炎<sup>6,7</sup>의 原因菌으로도 作用함이 報告된 바 있다.

*Staph hyicus* subsp *hyicus*는 건강한 돼지의 皮膚에서도 높은 빈도로 분리되고 있으며 어린 돼지일수록 분리율은 높게 나타나고 있다<sup>8,10</sup>. 또한 닭의 滲出性皮膚炎<sup>11</sup>과 건강한 닭의 皮膚<sup>9,12</sup> 그리고 소의 乳房炎乳汁<sup>13,14</sup>과 疥癬病巢<sup>15</sup>등에서도 분리되고 있는 이 菌은 coagulase와 耐熱性 DNase의 產生이 양성이면서 動物에만 偏在하는 숙주특이성이 있는 葡萄球菌으로 看做되고 있다. 한편 Phillips와 Kloos<sup>16</sup> 그리고 Hoover et al<sup>17</sup>은 돼지由來 菌

## 結 果

株는 protein A產生이 陽性인 반면에 닭과 소由來의 菌株는 陰性임을 報告했고 Devriese와 Oeding<sup>18</sup>은 仔豚에 대해 돼지由來菌株는 滲出性表皮炎을 유발시킬 수 있으나 닭과 소由來菌株의 接種에서는 어떤 病變도 관찰할 수 없음을 報告한 바 있어 動物種에 따라 분리된 이들菌 사이에는 어떤 特性의 차이가 있음을 示唆하고 있다.

近來 Staphylococcus菌種의 同定은 API STAPH-IDENT system (Analytab Products, N.Y.)를 이용함으로써 신속하고 간편하게 실시할 수 있게 되었다. 이 system은 10종류의 生化學的性狀의 검사가 35~37℃에서 5時間 培養後 판정되고 그 반응의 결과에 따라 *Staph aureus*를 포함하여 14菌種을 區別지게 한다. 이 研究에서는 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 同定을 위해 API STAPH-IDENT system의 精確성을 評價해 보았고 同時에 돼지由來菌株와 닭由來菌株 사이에 分離源에 따른 生化學的特性의 차이를 比較檢討하였다.

## 材料 및 方法

供試菌株 : 총 200株의 돼지 및 닭由來 *Staph hyicus* subsp *hyicus*를 사용하였다. 이들 供試菌株中の 80株는 哺乳仔豚의 滲出性表皮炎例와 健康豚의 皮膚로부터 분리된 것이고 나머지 120株는 건강한 닭의 皮膚로부터 분리되었다.

通常法에 의한 生化學的性狀의 檢査 : 供試菌株의 耐熱性 DNase 產生能은 Lachica et al<sup>19</sup>이 提示한 한천확산법으로 檢査하였고 hyaluronidase 產生能은 Cater와 Rundell<sup>20</sup>의 方法에 依하였다. Tween 80分解, phosphatase와 acetoin 產生能 그리고 질산염還元能檢査는 Devriese<sup>8</sup>의 方法에 따랐다. 糖分解시험은 여과멸균한 各種의 糖을 1%되게 加한 phenol red broth (Difco)와 purple agar base(Difco)에 供試菌을 接種하고 37℃에서 5日間 배양하면서 酸의 產生을 관찰하였다.

API STAPH-IDENT system에 의한 同定 : 各 供試菌株를 면양혈액이 5%함유된 trypticase soy agar (BBL)에 도말하여 20時間 배양한 후 2ml의 생리식염수가 분주된 시험판에 McFarland scale No 3의 혼탁도가 되게 菌浮遊液을 준비하였다. 이 菌浮遊液을 strip의 各 microcupule에 3滴씩 注入하고 37℃에서 배양하면서 5時間제와 24時間제인 2회에 걸쳐 製造會社의 指示에 따라 판독하였다. 陽性反應의 결과에 따라 4자리숫자로 표시된 各 菌株의 profile을 菌種同定을 위해 API STAPH-IDENT profile index와 比較하였다.

通常方法에 의한 돼지 및 닭由來 *Staph hyicus* subsp *hyicus* 菌株의 生化學的性狀은 Table 1에서와 같이 分離源에 따른 이들 菌株間에 뚜렷한 차이는 인정되지 않았고 다만 hyaluronidase 產生, trehalose 分解 그리고 질산염還元能에서 닭由來菌株가 돼지由來菌株에 비해 양성율이 약간 떨어지는 차이를 보였다. 닭由來 全菌株는 mannose 분해 陽性이었다.

API STAPH-IDENT strip에 들어 있는 10種의 基質에 대한 돼지 및 닭由來菌株의 培養時間에 따른 반응결과와 性狀의 차이는 Table 2에서와 같다. 供試菌들의 양성반응율은 배양시간을 연장함으로써 대체로 높게 나타났다. 그러나 mannose와 trehalose의 分解에 있어 돼지由來菌株는 5時間배양에서 모두가 강한 양성반응을 보였으나 닭由來菌株는 5時間배양에서 이들에 대한 양성율이 현저히 낮을 뿐만아니라 반응의 程度도 미약하다가 24時間 배양에서는 약한 양성반응을 나타냈던 대부분의 菌株가 陰性으로 轉換되는 mannose와 trehalose 분해의 偽陰性反應을 보였다. 돼지由來菌株는 96%이상  $\beta$ -glucuronidase 產生 陽性인데 반하여 닭由來의 全菌株는 陰性인 것으로 나타났다.

돼지 및 닭由來菌株의 同定을 위한 API STAPH-IDENT system의 精確성을 보면 Table 3에서와 같다. 돼지由來의 全菌株는 이 system에 의하여 同定됨을 볼 수 있었다. 그러나 닭由來菌株에 있어서는 이 system의

Table 1. Biochemical reaction of swine and avian strains of *Staph hyicus* subsp *hyicus* by conventional method

Test	No of positive reaction	
	Swine strains (n=80)	Avian strains (n=120)
Heat-resistant DNase	80	120
Hyaluronidase	80	117
Precipitation zone on Tween 80	80	120
Phosphatase production	79,1w	120
Acid from		
mannose <sup>a</sup>	79	120
mannitol <sup>a</sup>	0	0
trehalose <sup>a</sup>	80	103
salicin <sup>a</sup>	0	0
maltose <sup>b</sup>	0	0
Nitrate reduction	80	118

<sup>a</sup> In phenol red broth.

<sup>b</sup> In purple agar base plates.  
w; weak reaction.

Table 2. Biochemical reaction of swine and avian strains of *Staph hyicus* subsp *hyicus* by API STAPH-IDENT system after 5 h and 24 h of incubation

System test	No of positive reaction			
	Swine strains (n=80)		Avian strains (n=120)	
	Incubation of strip		Incubation of strip	
	5 h	24 h	5 h	24 h
Phosphatase	69	79	117	120
Urea	33	80	109	120
$\beta$ -glucosidase	56	79	107	120
Mannose	79	79	5,8w	8,3w
Mannitol	0	0	0	0
Trehalose	80	80	21,75w	20,1w
Salicin	0	0	0	0
$\beta$ -glucuronidase	73	77	0	0
Arginine	80	80	112	120
$\beta$ -galactosidase	0	0	0	0

w; weak reaction.

Table 3. Identification of *Staph hyicus* subsp *hyicus* of swine and poultry origin with the API STAPH-IDENT system after 5 h and 24 h of incubation

Origin of strains	Incubation	No(%) correctly identified	No(%) incorrectly identified
Swine strains (n=80)	5 h	80 (100)	0
	24 h	80 (100)	0
Avian strains (n=120)	5 h	87 (72.5)	33 (27.5)
	24 h	21 (17.5)	99 (82.5)

5시간 배양에서 供試한 120株中 87株(72.5%)가 다만 追加試驗 結果의 도움을 받아야 同定될 수 있었고 24時間배양 후에 同定되는 菌株數는 21株(17.5%)에 不過했다.

供試菌株에서 얻어진 API code profile의 分布는 Table 4에서와 같다. 돼지由來의 80菌株에서 모두 14개의 서로 다른 profile이 관찰되었는데 5時間 배양에서 나타난 12 profile중에서 70%以上の 菌株가 5560(31.3%), 7560(27.5%) 그리고 1560(12.5%)에 分布되어 있었다. 배양시간을 24時間까지 연장한 후에는 5 profile이 관찰되었고 이들중에서 대부분의 菌株 (92.5%)는 7560을 나타내었다.

닭由來의 120菌株에서는 12 profile이 관찰되었는데 이들중 *Staph hyicus* subsp *hyicus*에 해당하는 API code profile은 4개 뿐이었고 이 system의 5時間 배양에 의하여 同定될 수 있는 菌株中 대부분의 profile은 7440이었다. 배양시간을 24時間까지 연장한 후 同定될 수 있는 21株의 profile은 7440이 10株 그리고 7540이 11株였다. 닭由來菌株中에서 API STAPH-IDENT system에 의해 잘못 同定되는 菌株는 주로 mannose와 trehalose 分解의 偽陰性反應 때문이었고 그 結果로 나타난 code profile은 *Staph epidermidis*에 해당하는 것이었다.

API STAPH-IDENT profile index에 의거 同定の 精確성 程度에 따라 供試菌株를 區分해 보면 (Table 5), 돼지 由來菌株는 이 system의 5時間 배양에서 85%가 追加試驗이 필요없이 만족할 정도로 同定될 수 있었고 24時間까지 延長培養을 하면 菌株의 同定率은 93.8%로 더욱 높아졌다. 그러나 닭由來菌株에서는 5時間 培養後 72.5%가 追加試驗을 必要로 하는 "good likelihood, but low selectivity identification"의 程度로만 同定될 수 있었고 培養時間을 延長하면 菌株의 同定率은 현저히 낮아졌다.

## 考 察

葡萄球菌의 菌種 同定을 위해 사용방법이 간편하면서 5時間 배양으로 菌種이 결정될 수 있는 API STAPH-IDENT system이 널리 이용되고 있다. 이 system의 精確성에 관해서 Kloos 및 Wolfshohl<sup>21</sup>은 葡萄球菌의 14菌種을 사용하여 이 system과 通常의 方法인 Kloos 및 Schleifer<sup>22</sup>의 분류기준에 의한 同定 사이에 90%以上の 一致率을 報告했고 Doern et al<sup>23</sup>은 사람 由來의 菌株에서 *Staph aureus*의 73%菌株가 그리고 coagulase 陰性 staphylococci의 86%菌株가 이 system에

Table 4. Frequency of API STAPH-IDENT four-digit profiles among swine and avian strains of *Staph hyicus* subsp *hyicus*

Origin of strains	Incubation	Correctly identified		Incorrectly identified		
		API profile	No. of strains	API profile	No. of strains	Species
Swine strains (n=80)	5 h	0560+	3			
		1460	1			
		1540	3			
		1560	10			
		2560	2			
		3560	5			
		4540+	1			
		4560+	1			
		5540+	3			
		5560	25			
	6560+	4				
	7560	22				
	24 h	3560	1			
		6560+	1			
7460+		1				
7540+		3				
7560		74				
Avian strains (n=120)	5 h	5440+	2	1040	1	<i>Micrococcus spp</i>
		5540+	4	3040	12	<i>S epidermidis</i>
		7440+	74	4040	2	<i>S haemolyticus</i>
		7540+	7	5040	2	<i>S epidermidis</i>
				6440	1	<i>S warneri</i>
	24 h			7040	7	<i>S epidermidis</i>
				7400+	6	<i>S warneri</i>
				7500	2	<i>S aureus</i>
		7440+	10	3040	5	<i>S epidermidis</i>
		7540+	11	7040	94	<i>S epidermidis</i>

\* Profiles with additional tests.

Table 5. Tabulation of API STAPH-IDENT analytical profile index comments associated with identification of *Staph hyicus* subsp *hyicus*

Profile index comment	No(%) of strains			
	Swine strains (n=80)		Avian strains (n=120)	
	Incubation of strip		Incubation of strip	
	5 h	24 h	5 h	24 h
Excellent ID	35 (43.8)	0	0	0
Very good ID	27 (33.8)	75 (93.8)	0	0
Acceptable ID	6 (7.5)	0	0	0
GLLS	12 (15.0)	5 (6.3)	87 (72.5)	21 (17.5)
Incorrect	0	0	33 (27.5)	99 (82.5)

ID; identification; GLLS; good likelihood, but low selectivity identification.

의해 同定될 수 있었다 하였다. 한편 Langlois et al<sup>24</sup>은 젖소의 乳房源由來 葡萄球菌의 菌種同定에 이 system을 적용한 결과에서 coagulase 陰性 staphylococci 菌種 (41.8%) 보다 *Staph aureus* (93.9%)를 同定하는데 정확성이 더 높았다 하였고 Watts et al<sup>25</sup>도 이와 유사한 결

과를 報告한 바 있다.

이 研究에서는 돼지 및 닭由來 *Staph hyicus* subsp *hyicus* 菌株의 同定을 위한 이 system의 정확성 程度를 보았던 바 5時間 배양 後 돼지由來의 菌株는 85%가 이 system의 단독으로 정확히 同定될 수 있었다. 그러나

## 結 論

닭由來菌株에 있어서는 供試菌의 72.5%가 다만 몇가지의 追加試驗의 결과에 의존해야만 이 菌種이 최종 결정될 수 있었고 나머지 27.5%의 菌株는 다른 菌種들로 誤同定되고 있음을 관찰할 수 있었는데 이러한 結果로 미루어 보아 닭 由來 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 同定을 위한 수단으로서 이 system의 有用性은 制限的인 것으로 나타났다.

API STAPH-IDENT system의 培養時間이 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 同定率에 영향을 주는 것으로 나타났다. 이 strip의 5時間 배양의 성적에서 돼지由來의 85% 菌株가 追加試驗이 필요없이 이 system 단독으로 同定될 수 있었던 것이 24時間 培養 後의 결과에 서는 93.8%로 향상됨을 관찰할 수 있었다. 이 原因은 주로 phosphatase, urea 그리고  $\beta$ -glucosidase에서 培養時間의 연장에 따라 菌株의 陽性反應率이 높아진 결과로 분석될 수 있었다. Doern et al<sup>23</sup>은 사람由來 葡萄球菌의 菌種 同定에서 이 system의 培養時間을 연장함에 따라 mannitol 分解 陽性率이 높아졌고 그 결과 菌種의 정확한 同定率이 80.9%에서 90.4%로 까지 향상됨을 報告한 바 있다. 그러나 이 研究에 供試한 닭由來菌株에서 이 strip의 24時間 培養 後에는 대부분(82.5%)이 *Staph epidermidis*로 잘못 同定되고 있는 것으로 나타났다.

이 研究에 供試된 닭由來菌株가 이 system에 의한 同定반적으로 同定率이 낮아지면서 다른 菌種으로 誤同定되고 있는 이유로는 mannose와 trehalose의 分解能에서 偽陰性反應 때문인 것으로 나타났다. 이와같은 현상은 Longlois et al<sup>24</sup>이 젖소의 乳房炎 乳汁으로부터 분리된 *Staph hyicus* subsp *hyicus*와 *Staph hyicus* subsp *chromogenes*에서도 관찰된 결과임을 볼 때 닭 및 소由來 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 정확한 同定을 위해서는 耐熱性 DNase 산생, tween 80분해 그리고 通常法에 의한 mannose와 trehalose 分解試驗이 追加로 실시되어야 할 것으로 판단된다.

供試한 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 돼지와 닭 由來 菌株 사이에 生化學的의 性狀의 뚜렷한 차이는  $\beta$ -glucuronidase 産生能에서 볼 수 있었다. 돼지由來菌株의 96.3%가 이 효소의 産生이 陽性인 반면에 닭由來의 全菌株에서는 陰性으로만 관찰되었다. 이 菌種의 分離源에 따른 菌株間 特性의 차이에 관해 Phillips와 Kloos<sup>16</sup> 그리고 Hoover et al<sup>17</sup>은 protein A산생이 닭과 소由來菌株에서는 볼 수 없고 다만 돼지由來菌株에서 관찰됨을 報告한 바 있다. 따라서 protein A와 함께  $\beta$ -glucuronidase는 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 生物型 또는 生態型을 區別하는데 유용한 標識가 될 수 있을 것으로 사료된다.

돼지 및 닭由來 *Staph hyicus* subsp *hyicus*의 同定을 위한 API STAPH-IDENT system의 정확성을 評價해 보았고 同時에 이 system에 의해서 이 菌의 分離源에 따른 菌株間 生化學的의 特性의 차이를 比較檢討하였다. 돼지由來의 85% 菌株가 5時間 배양 後 追加試驗이 필요없이 이 system 단독으로도 同定될 수 있었고 24時間 배양 後에는 93.8%까지 同定率이 향상되었다. 그러나 닭由來菌株에서는 5時間 배양 後 72.5%가 정확한 同定을 위해서 追加試驗을 필요로 하였고 27.5%는 잘못 同定되고 있었다. 이 system의 24時間 배양 後에는 닭由來의 82.5%가 mannose와 trehalose의 偽陰性反應으로 인해 *Staph epidermidis*로 誤同定되고 있었다.

돼지由來의 96.3% 菌株가  $\beta$ -glucuronidase 産生反應에 대해 陽性을 보였으나 닭由來의 全菌株에서는 陰性인 것으로 나타났다.

## 參 考 文 獻

1. Sompolinsky D. De l'impetigo contagiosa suis et du *Micrococcus hyicus* n.sp. Schweiz Arch Tierheilkd 1953; 95:302~309.
2. Baird-Parker AC. The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources. J Gen Microbiol 1965; 38:363~387.
3. Baird-Parker AC.: *Micrococcaceae*. In Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore: Williams & Wikins Company, 1974; 487.
4. Mebus CA, Underdahl NR, Twiehaus MJ. Exudative epidermitis. Pathogenesis and pathology. Path Vet 1968; 5:146~163.
5. Devriese LA, Hajek V, Oeding P, et al. *Staphylococcus hyicus*(Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 1978; 28:482~490.
6. Phillips WE, King RE, Kloos WE. Isolation of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from a pig with septic polyarthritis. Am J Vet Res 1980; 41:274~276.
7. Noda K, Fukui T. Outbreaks of pyogenic arthritis in new-born piglets and stillbirth caused by *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*. Jpn J Vet Res 1986; 39: 305~310.
8. Devriese LA. Isolation and identification of *Staphylo-*

- coccus hyicus*. *Am J Vet Res* 1977; 38:787~792.
9. Takeuchi S, Kobayashi Y, Morozumi T, et al. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from pigs, chickens and cows. *Jpn J Vet Sci* 1985; 47:841~843.
  10. Park CK, Kang BK. Studies on exudative epidermitis in pigs:I. Isolation and some properties of *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* from diseased and healthy pigs. *Korean J Vet Res* 1986; 26:251~257.
  11. Nakabayashi D, Watanabe T, Honma H, et al. Exudative dermatitis in layer chickens associated with *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*. *J Jpn Soc Poult Dis* 1987; 23:12~20.
  12. Shimizu A, Ozaki J, Kawano J, et al. Distribution of *Staphylococcus* species on animal skin. *J Vet Med Sci* 1992; 54:355~357.
  13. Devriese LA. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cow's udders. *Res Vet Sci* 1979; 27:313~320.
  14. Park CK, Cho YJ. Studies on staphylococci isolated from bovine udder infections:II. Distribution and biochemical properties of coagulase-negative staphylococci. *Korean J Vet Res* 1983; 23:165~172.
  15. Devriese LA, Derycke J. *Staphylococcus hyicus* in cattle. *Res Vet Sci* 1979; 26:356~358.
  16. Phillips WE, Kloos WE. Identification of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* isolates from veterinary clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1981; 14:671~673.
  17. Hoover DG, Tatini SR, Maltais JB. Characterization of staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46:649~660.
  18. Devriese LA, Oeding P. Coagulase and heat-resistant nuclease producing *Staphylococcus epidermidis* strains from animals. *J Appl Bact* 1975; 39:197~207.
  19. Lachica RVF, Genigeorgis C, Hoeprieh PD. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl Microbiol* 1971; 21:585~589.
  20. Cater GR, Rundell SW. Identification of type A strain of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet Rec* 1975; 96:343.
  21. Kloos WE, Wolfshohl JF. Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. *J Clin Microbiol* 1982; 16:509~516.
  22. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1975; 1:82~88.
  23. Doern GV, Earls JE, Jeznach PA, et al. Species identification and biotyping of staphylococci by the API Staph-Ident system. *J Clin Microbiol* 1983; 17:260~263.
  24. Langlois BE, Harmon RJ, Akers K. Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the API Staph-Ident system. *J Clin Microbiol* 1983; 18:1212~1219.
  25. Watts JL, Pankey JW, Nickerson SC. Evaluation of the Staph-Ident and STAPHase system for identification of staphylococci from bovine intramammary infections. *J Clin Microbiol* 1984; 20:448~452.
-